

# 6 > Biofilmes de *Staphylococcus* em dispositivos médicos

Â. França, N. Cerca\*

IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710–057 Braga, Portugal

\* Autor para correspondência: nunocerca@ceb.uminho.pt

## 6.1 > Dispositivos médicos

Cateteres intravenosos e de diálise, válvulas cardíacas, articulações protéticas, próteses vasculares, dispositivos de assistência ventricular, *pacemakers*, *shunts* do fluido cérebro-espinhal e tubos endotraqueais são alguns dos vários dispositivos que salvam milhões de vidas em todo

o mundo. No entanto, todos estes dispositivos apresentam um risco intrínseco de desenvolverem infeções associadas à formação de biofilme nas suas superfícies.

As infeções associadas à colocação de dispositivos médicos foram as primeiras infeções identificadas como tendo origem na formação de biofilmes. Estas infeções são consideradas

**Tabela 6.1** > Principais dispositivos médicos afetados pela formação de biofilmes nas suas superfícies e os principais agentes patogénicos envolvidos.

Tipos de dispositivos	Agente bacteriano associado
Cateteres venosos centrais	<i>S. epidermidis</i>
Válvulas cardíacas	<i>S. epidermidis</i>
Dispositivos de fixação de fraturas	<i>S. epidermidis</i>
Próteses ortopédicas	<i>Staphylococci</i>
Cateteres peritoneais de diálise	<i>S. aureus</i>
<i>Shunts</i>	<i>Staphylococcus</i>
Implantes mamário	<i>Staphylococcus</i>
Implantes cocleares	<i>S. aureus</i>

importantes fontes de infeções nosocomiais, estimando-se que constituem cerca 60-70% das infeções nosocomiais reportadas nos Estados Unidos da América.

O género *Staphylococcus* é reconhecido como a causa mais frequente de infeções relacionadas com a formação de biofilme na superfície dos dispositivos médicos, como pode ser observado pela tabela 6.1. Este fenómeno está relacionado com o facto de a grande maioria das espécies deste género apresentarem-se como parte integrante da população comensal da pele e mucosas humanas, aumentando, por isso, o risco de infetar os dispositivos médicos que as penetrem.

## 6.2 > Género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus* pertence à família dos *Micrococcaceae*. São células esféricas Gram-positivas com diâmetro compreendido entre 0,5-1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados, apresentando-se, geralmente, sob a forma de cachos irregulares. As colónias formadas são arredondadas, lisas, elevadas, brilhantes e opacas, variando a sua cor de branco a amarelo dourado ou alaranjado. São anaeróbios facultativos, crescem facilmente na maioria dos meios de cultura usados em laboratório e a maioria das estirpes são metabolicamente versáteis, isto é, podem digerir proteínas e lípidos e fermentar uma grande variedade de açúcares.

### STAPHYLOCOCCUS E PATOLOGIA

As infeções provocadas pelo género *Staphylococcus* são muito variadas, tanto nas manifestações clínicas como no potencial de gravidade. Muitas das espécies pertencentes ao género constituem parte integrante da flora microbiana normal da pele e mucosas. No entanto, este género também inclui espécies consideradas

importantes agentes patogénicos. O género *staphylococcus* é constituído por 45 espécies de entre as quais, as espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentam maior relevância do ponto de vista médico.

*Staphylococcus aureus* coloniza, permanentemente ou de forma transitória, cerca de 20 a 40% da flora normal, observando-se uma maior incidência no pessoal médico, podendo esta atingir valores superiores a 60%. A contaminação dos dispositivos médicos pela bactéria depende, assim, da flora do paciente e do pessoal médico que procede à colocação dos mesmos. *S. aureus* pode provocar infeções superficiais da pele como impetigo e abscessos ou infeções invasivas sérias como artrite séptica, osteomielite e endocardite. *S. aureus* diferencia-se das outras espécies do género pelo facto de produzir a enzima coagulase, sendo, por isso, designado de coagulase-positivo.

As espécies coagulase-negativo não eram consideradas agentes patogénicos até há pouco tempo, no entanto, a sofisticação e aumento singular da utilização de dispositivos médicos e de técnicas invasivas, aliadas à maior debilidade imunobiológica dos pacientes, abriu novas oportunidades para que os estafilococos coagulase-negativos, em especial *S. epidermidis*, passassem a ser considerados agentes patogénicos de relevância no contexto de infeções associadas à formação de biofilme em dispositivos médicos. *S. epidermidis* causa predominantemente, infeções em indivíduos imunocomprometidos como recém-nascidos prematuros, pacientes sob tratamento imunossupressor e pacientes portadores de imunodeficiências. Em pacientes saudáveis, *S. epidermidis* causa infeções, apenas, após a penetração da pele e membranas mucosas, o que pode ocorrer devido a um trauma, inoculação ou colocação de dispositivos médicos. Estes pacientes podem desenvolver patologias graves como septicemias ou endocardites. As infeções associadas à formação de biofilmes

em dispositivos médicos provocadas por *S. aureus* e por *S. epidermidis* são similares, todavia, as primeiras obrigam a um maior cuidado médico exigindo, com maior frequência, a substituição dos dispositivos e administração de uma terapia longa de antibióticos.

Uma das maiores problemáticas das infecções provocadas por *Staphylococcus* é facilidade com que estes adquirem fatores de resistência genética codificados pelo cromossoma ou, mais frequentemente, pelo plasmídeo. Para além desta transferência genética, os estafilococos não apresentam nenhum mecanismo de resistência específico, sendo a formação de biofilme, sem dúvida, o mecanismo mais relevante envolvido na patogenia destas espécies.

## 6.3 > Formação de Biofilme em *Staphylococcus*

A formação de biofilme é um processo essencialmente biotápico, o qual envolve (1) a adesão inicial à superfície dos dispositivos (a qual pode ocorrer imediatamente após a colocação do dispositivo ou em períodos mais tardios) e (2) a subsequente fase de acumulação/maturação, compreendendo esta a adesão intercelular e forças de estruturação que são responsáveis pela estrutura tridimensional complexa característica dos biofilmes. A posterior libertação de células individuais ou grupos de células do biofilme é uma fase decisiva para a sobrevivência do biofilme, promovendo a disseminação da bactéria e levando à formação de novos focos de infeção.

### ADESÃO INICIAL

A adesão a superfícies não revestidas é um importante mecanismo de adesão que pode ocorrer imediatamente após a colocação do dispositivo no organismo, ou em sistemas *in vitro*. Este mecanismo é gerido por forças físico-

químicas, polaridade e, principalmente, por interações hidrofóbicas entre a parede celular bacteriana e o material que constitui o dispositivo. À parte das interações hidrofóbicas, as autolisinas (Atl), hidrolases de peptidoglicano, envolvidas em vários processos celulares tais como: divisão e separação celular e lise de células bacterianas induzida por antibióticos, estão também envolvidas na adesão inicial a superfícies não revestidas. Ao controlarem estes processos celulares têm uma ação direta na libertação de DNA (DNA extra-celular), o qual, por sua vez, também parece desempenhar uma função importante na adesão inicial. A proteína associada ao biofilme Bap (do inglês *Biofilm-Associated Protein*) confere carácter hidrofóbico à superfície celular da bactéria encontrando-se também implicada na adesão inicial.

O organismo humano reage rapidamente à presença de dispositivos médicos revestindo-os com proteínas e glico-proteínas tais como: fibronectina, vitronectina, fibrinogénio, albumina e imunoglobulinas. A ligação destas macromoléculas altera rápida e profundamente a superfície química do material e, conseqüentemente, as moléculas envolvidas na adesão a estes dispositivos. Estas proteínas da matriz do hospedeiro funcionam como importantes ligandos para recetores específicos presentes na superfície bacteriana, facilitando a colonização e posterior infeção dos dispositivos. Esta interação ocorre através de importantes componentes da superfície celular bacteriana que reconhecem moléculas da matriz do hospedeiro (MASCARAMM, do inglês *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*).

*S. aureus* e *S. epidermidis* expressam várias dessas moléculas de superfície, algumas delas funcionalmente equivalentes. Para além de atl/atIE (*S. aureus* e *S. epidermidis*, respetivamente) estar envolvida na adesão a superfícies não revestidas também medeia a interação com a vitronectina, apresentando, assim, uma função

dupla importantíssima na adesão inicial. A interação específica com fibrinogénio é mediada por um grupo de proteínas de superfície caracterizadas pela presença de várias repetições de serina-aspartato. Finalmente, a interação com a fibronectina parece ser conseguida através dos ácidos teicóicos e, em *S. epidermidis*, também é efetuada por uma proteína designada de proteína de ligação à matriz extra-celular do hospedeiro (Embp, do inglês *Extracellular matrix binding protein*).

## ADESÃO

### INTERCELULAR/MATURAÇÃO

Após a adesão inicial, o desenvolvimento do biofilme é caracterizado (1) pela adesão intercelular, a qual é conseguida através de proteínas de adesão, eDNA, ácidos teicoicos e polissacarídeos e (2) pela estruturação tridimensional típica do biofilme.

A adesão intercelular nos estafilococos é mediada, principalmente, pelo polissacarídeo de adesão intercelular (PIA, do inglês *Polysaccharide Intercellular Adhesin*), o qual é também designado de  $\beta$ 1,6-poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG) devido à sua estrutura química. A biossíntese do PNAG é resultado da expressão dos genes que constituem o locus *ica* (do inglês *Intercellular adhesion*), o qual compreende o operão *icaADBC* e o gene *icaR*. O operão *icaADBC* codifica as proteínas IcaA e IcaD (*N*-acetilglucosamina transferases) responsáveis pela elaboração da cadeia ativada dos monómeros de *N*-acetilglucosamina; IcaC (exportador putativo), responsável pela elongação dos monómeros e consequente transporte para a

superfície bacteriana e, pelo IcaB (deacetilase), responsável pelo processo de de-acetilação parcial. Este processo introduz cargas positivas no polissacárido o que contribui para a ligação deste à superfície e para outras funções biológicas envolvidas na formação do biofilme e evasão do sistema imunitário do hospedeiro. O gene *icaR* codifica uma proteína reguladora.

Apesar da importância do PNAG para a formação de biofilme em *Staphylococcus*, alguns estudos recentes evidenciaram que algumas estirpes de *S. epidermidis* *ica*-negativas podem formar biofilme. Assim, parece, que de uma forma parcial ou na sua totalidade, a formação de biofilme é também mediada pela ação de proteínas superficiais de adesão tais como Bap e proteínas associadas à acumulação de biofilme (Aap, do inglês *Accumulation-associated protein*). A Aap parece ancorar o PNAG à superfície celular sendo expressa, principalmente, sob condições de crescimento sésil e, portanto, está implicada na acumulação de biofilme na superfície dos dispositivos médicos. Contudo, existem evidências que apontam para a menor robustez dos biofilmes formados apenas pela intervenção destas proteínas em relação àqueles formados com PNAG.

A lise celular e a consequente libertação do DNA tem sido também implicada na formação de biofilme. De facto, como molécula polianiónica que é, o DNA tem a capacidade de ligar moléculas da matriz do biofilme de forma similar aos ácidos teicóicos e, assim contribuir para a maturação do biofilme. Existem já alguns estudos que indicam que o eDNA encontrado na matriz do biofilme pode mesmo ser excretado



**Figura 6.1** > Representação esquemática do locus *ica* (operão *icaADBC* e o gene *icaR*). As setas indicam o sentido em que ocorre a expressão genética.

1 para exercer a sua função e não apenas resultado  
2 da lise celular.

## 3 4 REGULAÇÃO DO LOCUS *ICA*

5 Uma série de reguladores globais, tais como:  
6 a proteína de ligação ao DNA designada de  
7 proteína reguladora acessória (*sarA*, do inglês  
8 *Staphylococcal accessory regulator*) e o factor  
9 alternativo sigma B ( $\sigma^B$ ) estão envolvidos no  
10 controlo da transcrição do locus *ica*. Estas duas  
11 proteínas reguladoras influenciam positivamente o  
12 operão *icaADBC*, contudo, através de mecanismos  
13 diferentes. O  $\sigma^B$  influencia positivamente a  
14 transcrição do operão *icaADBC* regulando  
15 negativamente *icaR*, enquanto *SarA* influencia  
16 positivamente o operão, regulando o promotor  
17 *icaA* independentemente de *icaR*. Em *S. aureus*  
18 a alteração do normal funcionamento de  $\sigma^B$   
19 não apresenta consequências para a formação  
20 do biofilme, demonstrando uma importante  
21 diferença na regulação do locus *ica* entre *S.*  
22 *epidermidis* e *S. aureus*. Para além de regular  
23 a transcrição do operão *icaADBC*, *sarA* regula  
24 vários outros genes incluindo o gene acessório  
25 regulador (*agr*, do inglês *accessory gene regulator*),  
26 responsável pelo sistema de comunicação  
27 intercelular *quorum sensing*, o qual é responsável  
28 pela expressão de vários fatores de virulência.  
29 Alterações no sistema *agr* estão associadas ao  
30 aumento do desenvolvimento de biofilme estando a  
31 ativação deste sistema associado com a disseminação  
32 do biofilme.

## 33 34 MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO 35 DE BIOFILMES DE 36 STAPHYLOCOCCUS

37 A libertação de células a partir do biofilme de  
38 uma forma controlada mantém a espessura e regula a  
39 taxa à qual ocorre a disseminação do biofilme. Os  
40 mecanismos subjacentes à libertação das células são  
41 ainda pouco conhecidos, porém, vários fatores podem  
42 estar envolvidos: 1) forças mecânicas (como o fluxo nos  
43 vasos sanguíneos);

2) degradação enzimática de exo-polímeros e 3) rutura de  
interações não-covalentes através de moléculas  
surfactantes.

A degradação enzimática dos fatores proteicos do biofilme foi considerado responsável pela libertação de células do biofilme de *S. aureus*, todavia, em *S. epidermidis* não foram obtidas evidências da presença dessas proteases. Alternativamente, as moléculas com propriedades surfactantes podem estar na origem do rompimento das ligações não-covalentes entre o PNAG e os polímeros da superfície ou entre as regiões hidrofóbicas da superfície bacteriana promovendo assim a disseminação do biofilme. As modulinas fenólicas solúveis (PSM, do inglês *Phenol-Soluble Modulins*), são uma classe de péptidos com propriedades surfactantes vincadas que parecem estar envolvidas tanto na estruturação da tridimensionalidade como também na disseminação dos biofilmes de *Staphylococcus*. A expressão destas proteínas é controlada pelo sistema *agr*. A expressão do sistema *agr* em biofilmes é limitada às áreas superficiais expostas, onde ocorre a regulação da disseminação do biofilme através de um aumento da expressão de PSM. Danos permanentes no sistema *agr* levam a uma formação excessiva de biofilme, a qual é uma vantagem para a sobrevivência do biofilme em estádios específicos ou em tipos de infeções particulares. Notavelmente, estirpes de *Staphylococcus agr* negativas ocorrem naturalmente e podem ser isoladas a partir de infeções associadas à formação de biofilme a uma taxa de aproximadamente 25%.

## 6.4 > Controlo das infeções por *Staphylococcus* em dispositivos médicos

As infeções microbianas associadas à formação de biofilme são reconhecidas como agentes

etiológicos de várias infecções crônicas e persistentes. Provavelmente, devido ao crescimento muito lento dos biofilmes, estas infecções são difíceis de diagnosticar e tratar com as abordagens convencionais. Com o aumento da utilização de dispositivos médicos, a incidência destas infecções também aumentou, sendo a profilaxia ou a limitação da colonização dos dispositivos médicos as medidas mais simples e efetivas a adotar.

## TRATAMENTO

A estratégia mais efetiva para o tratamento de biofilmes é a intervenção cirúrgica aliada à aplicação de uma longa terapia antibiótica sistêmica. Contudo, deve-se apostar em medidas profiláticas em vez de medidas terapêuticas de forma a evitar a colonização e consequente formação de biofilme na superfície dos dispositivos médicos.

## PROFILAXIA

Existem várias medidas profiláticas, que podem ser mais ou menos eficazes, dependendo do tipo de dispositivo e microrganismo associado. As estratégias profiláticas utilizadas incluem, em primeiro lugar, a higienização de todos os procedimentos de inserção de dispositivos médicos, imersão ou incubação dos dispositivos em antibióticos e uso de antibióticos de forma sistêmica durante as cirurgias. Contudo, estratégias profiláticas que recorram ao uso de antibióticos devem ser completamente desencorajadas, pelo facto de poderem agravar a atual problemática da resistência aos antibióticos. Por exemplo,

no caso de biofilmes de *Staphylococcus*, estas estratégias já apresentam sucesso limitado, uma vez que a resistência aos antibióticos encontra-se difundida por todo o género. A título de exemplo, nos EUA, cerca de 70-90% dos isolados de *S. epidermidis* e 40-60% dos de *S. aureus* são resistentes à metilina, o antibiótico de escolha face a infecções estafilocócicas.

Porém, existem medidas profiláticas novas, tais como a alteração da superfície dos dispositivos médicos de forma a ligar inibidores de processos chave da formação de biofilme, como por exemplo, a ligação de um péptido responsável pelo rompimento das vias *quorum sensing* em *Staphylococcus* (RIP, do inglês *RNAIII-inhibiting protein*).

Finalmente, a utilização de dispositivos médicos capazes de emitir ondas acústicas de baixa energia, corrente elétrica ou ultra-som pulsado constituem novas estratégias profilática promissoras.

## 6.5 > Conclusão

À parte de todos os importantes estudos que descrevem os genes, moléculas e mecanismos envolvidos na formação de biofilme e medidas profiláticas e de tratamento deste tipo de infecções, são necessários estudos que visem a interação entre o agente patogénico e o hospedeiro. Estes estudos poderão permitir o desenvolvimento de estratégias efetivas e duradouras, como por exemplo, a vacinação (ver capítulo 21).

## NO FINAL DA LEITURA DESTE CAPÍTULO, O LEITOR DEVE:

- > Entender a relevância das infecções de *Staphylococcus* associadas à formação de biofilme em dispositivos médicos;
- > Identificar as diferentes fases da formação do biofilme;
- > Identificar a diferença entre a adesão inicial em superfícies revestidas e não revestidas;
- > Identificação das moléculas de maior importância para a maturação e estruturação dos biofilme de *Staphylococcus*;
- > Identificar as estratégias profiláticas e terapêuticas utilizadas atualmente.

## 6.6 > Leitura recomendada

- Heilmann,C., Schweitzer,O., Gerke,C., Vanittanakom,N., Mack,D., and Gotz,F. (1996) *Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol 20: 1083-1091.
- Mack,D., Fischer,W., Krokotsch,A., Leopold,K., Hartmann,R., Egge,H., and Laufs,R. (1996) *The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1.6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis*. Journal of Bacteriology 178, 175-183.
- Otto,M. (2009) *Staphylococcus epidermidis--the «accidental» pathogen*. Nat Rev Microbiol 7: 555-567.
- Otto,M. (2008) *Staphylococcal biofilms*. Curr Top Microbiol Immunol 322: 207-228.
- Rohde,H., Burandt,E.C., Siemssen,N., Frommelt,L., Burdelski,C., Wurster,S. et al. (2007) *Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus isolated from prosthetic hip and knee joint infections*. Biomaterials 28: 1711-1720.
- Uckay,I., Pittet,D., Vaudaux,P., Sax,H., Lew,D., and Waldvogel,F. (2009) *Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis*. Ann Med 41: 109-119.
- Vuong,C., Kocianova,S., Voyich,J.M., Yao,Y., Fischer,E.R., DeLeo,F.R., and Otto,M. (2004a) *A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence*. J Biol Chem 279: 54881-54886.
- Vuong,C., Kocianova,S., Yao,Y., Carmody,A., and Otto,M. (2004b) *Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of Staphylococcus epidermidis in vivo*. Journal of Infectious Diseases 15: 1498-1505.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43